

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS
—

(11) N° de publication : **2 596 865**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **86 04831**

(51) Int Cl^a : G 01 N 27/30, 27/40; C 12 Q 1/32.

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

(22) Date de dépôt : 4 avril 1986.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 41 du 9 octobre 1987.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

(71) Demandeur(s) : *Société anonyme dite : SOCIÉTÉ NA-
TIONALE ELF-AQUITAINE.* — FR.

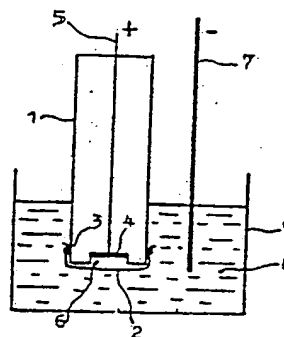
(72) Inventeur(s) : Jérôme Soupe, Maurice Comtat et Phi-
lippe Goulas.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Armand Kohn.

(54) Nouveau procédé et dispositif pour le dosage de la carnitine.

(57) Dosage de la carnitine par voie enzymatique. On fait agir
du nicotinamide adénine dinucléotide sous sa forme oxydée,
NAD⁺, sur la carnitine du milieu à étudier, en présence de
carnitine déshydrogénase, de façon à transformer la carnitine
en déhydrocarnitine, et que l'on dose ampérométriquement la
forme réduite NADH résultante.



FR 2 596 865 - A1

D

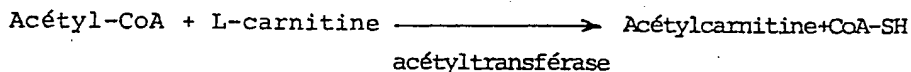
La présente invention concerne un nouveau procédé de dosage de la carnitine, et plus particulièrement un procédé électrochimique pour le dosage de la L-carnitine, c'est-à-dire de l'acide L-hydroxy-3 triméthylamino-4 butyrique, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{COO}^-$. Elle comprend également un dis-

positif pour la réalisation de ce procédé, notamment une électrode particulière pour la mesure des courants proportionnels à la concentration en carnitine dans une solution donnée, lorsqu'une différence de potentiel est appliquée à celle-ci.

La détermination de la concentration en L-carnitine dans différents milieux, présente un intérêt pratique dû à ce que ce composé joue un rôle essentiel dans l'oxydation des acides gras dans l'organisme animal ; la déficience en L-carnitine est susceptible de donner lieu à des syndromes auxquels on peut remédier si l'on connaît la teneur en cette substance. La L-carnitine a également été proposée comme agent d'investigation thyroïdien. Cette substance est assez répandue dans la nature : on la trouve dans la plupart de tissus animaux, en particulier dans le muscle, dans les plantes et dans les levures.

La méthode de dosage de la L-carnitine, utilisée jusqu'à présent, consiste en l'acétylation enzymatique au moyen de l'acétyl-coenzyme A, ce qui conduit à la libération de la coenzyme CoA-SH en quantité équivalente à celle de la carnitine mise en jeu. CoA-SH est alors dosée par une des méthodes connues. On en trouve une description détaillée de PEARSON, TUBBS et CHASE dans "Methods of Enzymatic Analyses", vol. 4, p.1758 (Editeur BERGMEYER Chem. Academic Press, New-York 1976).

Le coenzyme A, formé dans la réaction
carnitine



est dosé par une des voies suivantes.

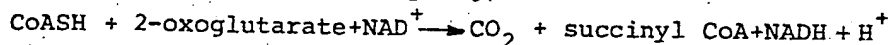
Par la thiokinase



Thiokinase

- 5 On mesure l'accroissement d'absorbance à 300 nm correspondant au sorbyl CoA.

Par l'oxo-2 glutarate déshydrogénase:



- On mesure l'accroissement d'absorbance à 340 nm correspondant au NADH. Ces deux méthodes nécessitent des enzymes hautement purifiées et sont d'un emploi assez compliqué. Par voie chimique, à l'aide du DTNB (acide-dithio-5,5 bis-p-nitro-2 benzoïque) qui réagit avec le CoASH pour donner l'anion thio-5 nitro-2 benzoate qui absorbe fortement à 15 412 nm; cette méthode est limitée par le fait que certains extraits biologiques contiennent des substances qui réduisent le DTNB.

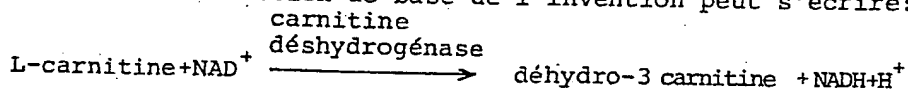
- En définitive, quelle que soit la variante de la méthode classique, on se heurte à des difficultés, dont 20 la plus grande est la nécessité de disposer d'un milieu purifié, exempt de substances qui faussent les résultats de l'analyse.

- La présente invention apporte un perfectionnement sensible à l'état de cette technique par la réalisation d'un procédé de dosage de la carnitine, qui permet 25 l'obtention de résultats très précis, sans nécessiter la purification de l'échantillon à analyser. Le procédé suivant l'invention rend possible la détermination spécifique et exacte de la teneur en carnitine dans différents milieux biologiques, pouvant renfermer diverses impuretés, notamment des protéines. 30

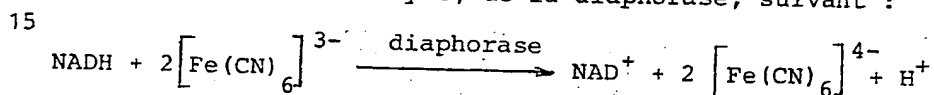
- Le nouveau procédé est caractérisé en ce que l'on fait agir du nicotinamide adénine dinucléotide sous sa forme oxydée, NAD^+ , sur la carnitine du milieu à étudier, 35 en présence de l'enzyme, carnitine déshydrogénase, de façon

à transformer la carnitine en déhydrocarnitine, au dépens du NAD^+ qui passe à l'état de sa forme réduite NADH . Cette dernière peut être dosée ampérométriquement, par une méthode connue en soi, et fournir une grandeur équivalente à celle de la carnitine ainsi oxydée.

La réaction de base de l'invention peut s'écrire:

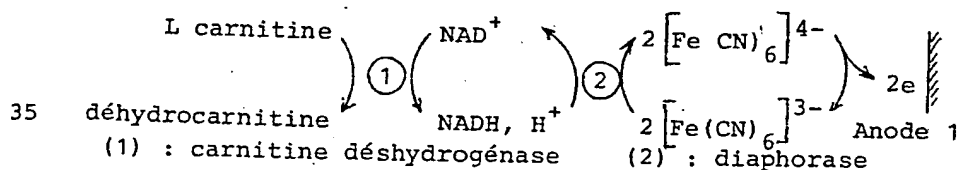


Le NADH formé peut être déterminé, par exemple, par la méthode de THOMAS et CHRISTIAN "Amperometric measurement of hexacyanoferrate (III) coupled dehydrogenase reactions" (Analyt. Chim. Acta, 82, 265 - 1976). Dans cette méthode NADH est réoxydé en NAD^+ au moyen de l'ion ferricyanure avec, comme enzyme, de la diaphorase, suivant :



Les opérations suivant l'invention peuvent être effectuées à différentes températures, notamment entre 0° et 40°C , et de préférence entre 15° et 30°C .

Dans un mode de réalisation de l'invention, on utilise un capteur constitué par une électrode de platine recouverte d'une membrane semi perméable qui délimite avec le métal une chambre de réaction, de quelques dizaines de microns d'épaisseur, renfermant un mélange de carnitine déshydrogénase, de diaphorase, de NAD^+ et de ferricyanure. Lorsque ce capteur est mis au contact d'une solution de L-carnitine, le substrat diffuse à travers la membrane, la carnitine déshydrogénase catalyse l'oxydation de la L-carnitine par le NAD^+ , la diaphorase réoxyde le NADH au dépens du ferricyanure, lui-même régénéré électrochimiquement à l'électrode selon le schéma suivant :



l'intensité du courant traversant le circuit est proportionnelle à la concentration en L-carnitine.

Bien que l'ion ferricyanure convienne particulièrement au dosage du NADH formé, ce dosage peut également s'effectuer au moyen d'autres réactifs capables de faire passer NADH à l'état de NAD^+ ; tels sont par exemple l'oxygène, certains colorants, le cytochrome, etc.

Le dispositif suivant l'invention est - dans ses grandes lignes - construit comme ceux de la technique antérieure. Un appareil simple, selon Fig. 1, comprend un tube ou tige 1 fermé en bas par une membrane semi-perméable 2, fixée à la paroi extérieure du tube au moyen d'une bague 3. Au-dessus de la membrane se trouve un disque 4 en matière conductrice 4, inoxydable, reliée par un conducteur 5 à la borne + d'une source de tension continue. Entre le disque 4, formant l'anode, et la membrane 2 subsiste un petit espace 6 qui constitue une chambre de réaction ; c'est dans cette chambre que l'on place la solution d'enzyme à utiliser. Le fil conducteur 7 constitue la cathode. L'ensemble 1 à 7, qui forme le capteur enzymatique, plonge dans un récipient 9 contenant les réactifs nécessaires au dosage et la solution à étudier 8. Le capteur est monté en série avec une source de tension continue E et une résistance R, comme montré schématiquement sur la figure 3. Des prises d'enregistrement se trouvent aux bornes de la résistance R.

Voici à titre d'exemple non limitatif un mode de réalisation de l'invention.

L'électrode 4 (figure 1) est constituée par un disque de platine de 3 mm de diamètre, enchassé dans un tube cylindrique 1 en matière plastique, recouvert d'une membrane semi-perméable 2 en cellophane, dont le seuil de coupure est de 12000 environ. La chambre de réaction 6, délimitée par l'électrode 4 et la membrane 2, a un volume de 3ul et contient les deux enzymes.

La rapidité du transfert électronique :

$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} \rightleftharpoons \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} + e^-$ sur électrode de Pt rend possible l'emploi d'un dispositif à deux électrodes faiblement polarisées. L'électrode auxiliaire est une électrode de Pt. Un potentiostat permet d'imposer un potentiel 0,3 V entre la cathode et l'anode. L'intensité du courant d'électrolyse est mesurée à l'aide d'une résistance de 100 k Ω placée en série dans le circuit et, aux bornes de laquelle est branché un enregistreur de forte impédance. Un voltmètre à haute impédance d'entrée permet par ailleurs de contrôler la différence de potentiel entre les deux électrodes au cours de l'électrolyse.

La solution enzymatique de la chambre de réaction est constituée par 3 μl d'une solution de tampon phosphate 50 mM pH 7,5, contenant 2 unités de carnitine déshydrogénase de Pseudomonas putida (EC.1.1.1. 108) et 5 unités de diaphorase de microorganisme (EC 1.6.99.). La solution électrolytique de 5 ml est un tampon TRIS/HCl 50 mM pH 9, 16 mM en ferricyanure de potassium et 10 mM en NAD^+ .

Les conditions expérimentales ont été choisies de façon à ce que l'étape limitante du processus soit la vitesse de diffusion de la L-carnitine à travers la membrane. A l'état stationnaire l'intensité du courant est alors directement proportionnelle à la concentration de L-carnitine dans la solution externe à doser.

La mesure s'effectue de la façon suivante. L'électrode est plongée dans la solution électrolytique qui est agitée à l'aide d'un agitateur magnétique, et l'on attend la stabilisation du courant de base. Puis on ajoute la L-carnitine : celle-ci diffuse à travers la membrane et est oxydée par la carnitine déshydrogénase. On enregistre la courbe donnant l'intensité du courant en fonction du temps. Au bout de deux minutes environ, on obtient un palier correspondant à l'état stationnaire (Fig. 2). On revient à la ligne de base en 10 à 15 minutes^{en} rinçant l'électrode dans la solution d'électrolyte qui sert à la mesure

suivante.

Ces opérations sont illustrées par le graphique de la Fig. 2, de $i = f(t)$: A indique le moment d'injection de la L-carnitine, B le palier du courant et C - D le retour à la ligne de base (rinçage du capteur).

Le tracé de la courbe de l'intensité du courant à l'état stationnaire, fonction de la concentration en L-carnitine, permet d'obtenir une droite pour des concentrations en L-carnitine comprises entre 0,1 et 2 mM, ce qui correspond à des courants compris entre 0,05 μA et 1,1 μA . La précision des mesures est de 2% même en milieu impur, donc comparable aux dosages enzymatiques utilisant l'acétylcarnitine transférase en milieu convenablement purifié.

L'invention est illustrée par les exemples non limitatifs qui suivent.

EXEMPLE 1

Un étalonnage type de l'électrode à L-carnitine est obtenu de la façon suivante.

L'électrode est plongée dans 5 ml de solution électrolytique agitée à l'aide d'un barreau aimanté. Après stabilisation du courant de base, on injecte 10 μl d'une solution à 50 mM en L-carnitine. Au bout de deux minutes le courant traversant le système atteint le palier de 0,05 μA . L'électrode est alors trempée dans 5 ml de solution électrolytique pour rinçage, le retour à la ligne de base se fait au bout de 8 minutes (C-D Fig. 2).

On répète la mesure avec 20, 50, 100, 150 et 200 μl de la solution 50 mM en L-carnitine.

Les courants enregistrés sont respectivement de 0,1 μA ; 0,28 μA ; 0,55 μA ; 0,8 μA et 1,1 μA . Le tracé de la courbe Intensité (μA) en fonction de la concentration en L-carnitine est une droite.

EXEMPLE 2

Une étude du vieillissement de l'électrode a été

menée durant 10 jours. Chaque jour on trace une courbe d'étalonnage comme décrit dans l'exemple 1.

Entre deux séries de mesures, le capteur est conservé à 4°C dans une solution de tampon phosphate 50 mM pH 7,5.

- 5 La réponse du capteur reste linéaire pendant les 10 jours pour des concentrations en L-carnitine comprises entre 0,1 et 2 mM, mais l'intensité du courant enregistré diminue chaque jour, pour atteindre le 10ème jour 15% de celle du début.

10 EXEMPLE 3

L'électrode à L-carnitine a permis de suivre en 70 heures l'avancement d'une réaction de bioconversion de la déhydro-3 carnitine en L-carnitine, catalysée par la carnitine déshydrogénase.

- 15 On a utilisé un réacteur de 2 litres équipé d'un thermostat réglé à 30°C ; il contenait 1 litre d'un milieu aqueux des composants suivants :

phosphate de sodium et de potassium 50 mM, pH 7,5 ;
NAD⁺, 0,6 mM ;

- 20 carnitine déshydrogénase 800 unités ;
formiate déshydrogénase 500 unités ;
formiate de sodium 150 mM ;
chloramphénicol 120 mg.

On injectait alors une solution 0,8 molaire en chlorhydrate

- 25 de déshydro-3 carnitine et 0,8 molaire en acide formique.
La vitesse d'injection était de 1,2 ml/h. Le pH était maintenu à 7,5 par addition d'ammoniaque 2N contrôlée à l'aide d'un pH-mètre à titrage automatique. Toutes les deux heures on prélève une portion aliquote de la solution de bioconversion convenablement diluée dans du tampon phosphate pH 7,5
30 50 mM, de façon à avoir une concentration en L-carnitine dans la solution électrolytique voisine de 1 mM. Ainsi dose-t-on la carnitine tout au long de la bioconversion.

EXEMPLE 4

- 35 Le capteur à L-carnitine a permis de contrôler

les effluents d'une chromatographie échangeuse d'ions destinée à purifier la L-carnitine obtenue à la fin de la réaction de bioconversion.

290 ml d'une solution 364 mM en L-carnitine (17g) sont chargés dans une colonne de 300 ml de résine cationique IR 120. La colonne est rincée à l'eau (1 litre) et la teneur en L-carnitine de l'effluent est contrôlée à l'aide du capteur ; cela a permis de constater que toute la carnitine déposée ne reste pas accrochée sur la résine.

On récupère ainsi, dans les eaux de lavage, 9 g de L-carnitine non retenue par la colonne. La L-carnitine restante (8 g) est éluée avec une solution d'ammoniaque 2 N (500ml).

EXEMPLE 5

Pour limiter la consommation en NAD^+ , on a utilisé un NAD^+ greffé sur un polymère hydrosoluble, Polyéthylène glycol 20000, qui est emprisonné dans la chambre de réaction avec les deux enzymes. La réponse du capteur est toujours linéaire pour des concentrations en L-carnitine entre 0,1 mM et 2 mM mais la sensibilité est diminuée par 2.

Un essai similaire a été effectué avec du dextrane 25000 en tant que polymère support ; les mêmes résultats ont été obtenus.

Revendications

1. Procédé de dosage de la carnitine par voie enzymatique, caractérisé en ce que l'on fait agir du nicotinamide adénine dinucléotide sous sa forme oxydée, NAD^+ , sur la carnitine du milieu à étudier, en présence
5 de carnitine déshydrogénase, de façon à transformer la carnitine en déhydrocarnitine, et que l'on dose ampérométriquement la forme réduite NADH résultante.
2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le NADH est dosé enzymatiquement par oxy-
10 dation au moyen de l'ion ferricyanure, en présence de diaphorase.
3. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le NADH est dosé par oxydation au moyen de l'oxygène.
- 15 4. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le NADH est dosé par oxydation au moyen d'un colorant.
5. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le NADH est dosé par oxydation au moyen
20 de cytochrome.
6. Dispositif pour la réalisation du procédé suivant une des revendications 1 à 5, qui comprend un capteur formé d'un tube ou d'une tige (1) dont l'extrémité inférieure porte une membrane semi-perméable (2) face à une
25 électrode (4), une chambre de réaction (6) de très faible profondeur étant prévue entre la membrane (2) et l'électrode (4), caractérisé en ce que cette chambre contient une solution aqueuse de carnitine déshydrogénase, dans un tampon de pH.
- 30 7. Dispositif suivant la revendication 6, caractérisé en ce que la solution contenue dans la chambre (6) renferme également une enzyme capable de promouvoir la réoxydation du NADH en NAD^+ par un réactif d'oxydation, en particulier la diaphorase.

1/1

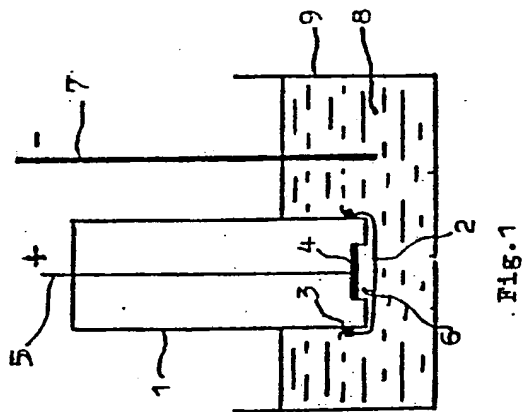
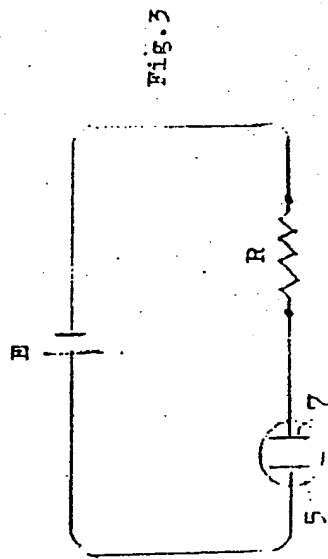


Fig. 2

